

The epidermal growth factor receptor (EGFR) : family members as targets to improve the radiosensitivity of human malignant solid tumors

Citation for published version (APA):

Lammering, G. (2004). *The epidermal growth factor receptor (EGFR) : family members as targets to improve the radiosensitivity of human malignant solid tumors*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.20041202gl>

Document status and date:

Published: 01/01/2004

DOI:

[10.26481/dis.20041202gl](https://doi.org/10.26481/dis.20041202gl)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Download date: 06 May. 2023

V.1 Summary

The epidermal growth factor receptor and the other ErbB receptor- tyrosine kinases play an important role in the neoplastic growth control of many carcinoma and glioma cells (1-4). This is a result of the activation of receptor tyrosine kinases with secondary stimulation of downstream signal transduction pathways (4). As in the case with other growth factor receptors, an increase in EGFR expression can be the result of gene amplification, increased transcription, mRNA translation or mutation. This leads to an unregulated increased receptor signal. For many carcinomas and gliomas an increased EGFR activity is correlated with neoplastic progression and enhanced tumor growth (5,6). The overexpression of EGFR in autocrine growth regulated carcinoma and glioma cells as part of the neoplastic progression is frequently associated with the expression of mutant forms (5,7-10). The most frequent EGFR mutation is a variant called EGFRvIII, which is the result of a deletion of exons 2-7 of the EGFR gene (8). This deletion results in a receptor with a constitutively active tyrosine kinase which ligand- independently can induce cell transformation (6,11). EGFRvIII is only present on the cell surface of tumors, but not detectable in normal tissue (5,7). Another results from the observation that this receptor is only expressed *in vivo* in tumor cells and is rapidly down regulated in cultured tumor cells *in vitro*. Therefore, to date mechanistic studies to elucidate the unique functions of EGFRvIII have been limited

Previous studies demonstrated that irradiation of tumor cells can result in an immediate activation of the ErbB- family of receptors and that repeated radiation exposures of 2 Gy lead to an increased expression of EGFR (12-14). This radiation- induced activation of EGFR is defined by a several-fold increase in the tyrosine phosphorylation with a secondary activation of existing signalling transduction cascades of MAPK and PI-3-K (12,15-17). The radiation- induced activation of the EGFR family of receptors leads to a dose-dependent proliferative response, which can be observed after single, as well as repeated radiation exposures (13,16,18). It has therefore been concluded that the radiation- induced activation of EGFR is involved in the mechanism of accelerated proliferation or repopulation. This cellular proliferative response after repeated radiation exposures leads to increased renewal of tumor clonogens (19,20). Considering the increased biosynthetic activity of rapidly proliferating tumor cells, it can be assumed that this will lead to an improved capacity for DNA damage repair.

Because the radiation- induced proliferative as well as the improved DNA repair responses of tumor cells counteract the toxic effects of radiotherapy, we have defined them as EGFR- family- induced cytoprotective responses of tumor cells. Considering the special role of the EGFR family in

initiating these cytoprotective responses following radiation, disruption of ErbB receptor function should prevent the cytoprotective responses and therefore mediate tumor cell radiosensitization.

The thesis project presented herein is based on the hypothesis that the inhibition of the radiation-induced activation of the EGFR family can improve the radiosensitivity of tumor cells independent of their varying ErbB expression profiles. In order to effectively block the function of the EGFR family of receptors, we used a genetic approach of adenoviral overexpression of a dominant-negative EGFR, called EGFR-CD533 (Figure 1.1.5). EGFR-CD533 has the advantage that it does not only inhibit the function of EGFR itself, but also the function of the whole ErbB receptor-tyrosine kinase network and also the function of naturally occurring mutant EGFR species.

First of all it was important to clarify the relative role of the ErbB 1-4 receptor tyrosine kinases in radiation signal transduction responses of human tumor cells. Previously, the downstream consequences of the radiation-induced activation of the ErbB receptors were thought to be indistinguishable from those obtained with growth factors. In order to identify potential differences of downstream consequences between the effects of growth factor and radiation, we compared the effects in mammary carcinoma cell lines differing in their ErbB expression profiles. As an important finding we were able to demonstrate that in contrast to treatment of cells with growth factors with ErbB 1 or ErbB4 specificity, which resulted in hierarchic transactivations of ErbB2 and ErbB3, radiation indiscriminately activated all ErbB species with the activation profile reflecting the cells' ErbB expression profile (Chapter II.1). Furthermore, ErbB 2 was identified as a modulator of ErbB 1 or ErbB4 leading to different downstream MAPK response profiles to radiation exposure (Chapter II.1). Therefore, our data demonstrated for the first time that ErbB expression profiles of human carcinoma cells could influence ErbB receptor activation in response to ionizing radiation. Thus, therapeutic interventions to radiosensitize human tumor cells should consider inhibition of the function of the entire ErbB receptor-tyrosine kinase network in order to effectively improve radiosensitivity independent of the varying ErbB expression profiles. This encouraged us to further move on with the development of a genetic approach of inhibiting the ErbB receptor tyrosine network through expression of dominant-negative EGFR-CD533.

We therefore further investigated the capacity of a gene therapeutic approach of using replication-incompetent adenovirus-mediated transfer of EGFR-CD533 to enhance the radiosensitivity by examining the direct radiosensitization *in vitro* for a broad spectrum of different tumor cell lines representing varying expression profiles of the ErbB receptors (Chapter II.2). After having characterized all tested cell lines for their different ErbB receptor expression profile and after

having optimized the experimental conditions for adenoviral gene transfer of EGFR-CD533, our experiments revealed complete inhibition of radiation- induced activation of EGFR upon EGFR-CD533 expression. Clonogenic survival analyses linked the expression of EGFR-CD533 to a significant increase in the intrinsic radiosensitivity for all tested cell lines after single as well as repeated radiation exposure experiments (Chapters II.2, III.2). Thus, our data provided evidence that all cell lines tested can be effectively transduced to express EGFR-CD533 by a gene therapeutic approach using Ad-EGFR-CD533 and are effectively sensitised to ionizing radiation.

These results prompted us to further test our gene therapeutic approach in xenograft tumors *in vivo*. We therefore introduced the adenoviral vector containing EGFR-CD533 into xenograft tumors in nude mice and evaluated whether the percentage of transduced tumor cells achieved can influence the tumor response to ionizing radiation. Furthermore, we tightly associated data from *in vivo*/ *in vitro* experiments in order to examine whether the mechanism underlying the radiosensitization *in vitro* also apply to the mechanism *in vivo*. To determine the susceptibility of U-87 MG cells and MDA-MB-231 cells to transduction with adenovirus, we first established the optimal transduction conditions by use of the Ad-LacZ reporter virus gaining an overall 59-65% and 44% transduction efficiency, respectively (Chapter III). Under these conditions, intratumoral infusion of Ad-EGFR-CD533 resulted in a significant radiosensitization, yielding a dose-enhancement ratio of 1.8 and 1.85 after 3 repeated radiation exposures of 3 and 1.5 Gy for U-87 MG and MDA-MB-231 tumors, respectively, which was comparable to the extent of radiosensitization conferred with cells from MDA-EGFR-CD533 tumors, in which all of the cells are engineered to stably overexpress EGFR-CD533 (Chapter III.3). These data provided evidence that a gene therapeutic approach of overexpressing a dominant- negative EGFR-CD533 by use of *in vivo* adenoviral vector delivery can effectively radiosensitize xenograft tumors after repeated radiation exposures. The mechanisms underlying this radiosensitization occurs by the same mechanisms in xenograft tumors as in cultured cells, thus affirming the therapeutic potential of this approach (Chapter III.3).

Another important aspect of our thesis project presented herein included investigations on the modulating effects of EGFRvIII on acute cellular radiation responses and possible influences on tumor cell survival after irradiation. As EGFRvIII is not expressed in cultured cells, we first performed these mechanistic studies in a transient transfection CHO cell system (Chapter IV.1). As expected, EGF activated EGFRwt with no effect on EGFRvIII. In contrast, a single radiation exposure of 2 Gy resulted in an immediate 4.3-fold increase in Tyr phosphorylation, which immediately induces secondary downstream increases in MAPK and Akt activity, by far exceeding the increases induced by radiation-induced EGFRwt activation (Chapter IV.1). Consequently,

radiation- induced activation of EGFRvIII resulted in an effective modulation of CHO cell radiosensitivity, thus identifying EGFRvIII as another important target for tumor cell radiosensitization (Chapter IV.1). In order to next enable investigations of EGFRvIII function in human malignant glioma cells in vitro, also taking into account the frequent expression of EGFRvIII in malignant glioma tumors, we developed an adenoviral vector to overexpress EGFRvIII in cultured cells in vitro. In addition, we examined EGFRvIII function under conditions of intrinsic expression in xenograft tumors and furthermore explored the feasibility of Ad-EGFR-CD533 for inhibiting EGFRvIII function in vitro and in vivo. Our studies revealed that ionizing radiation produces a significant activation of EGFRvIII in vivo, which induces a more powerful cytoprotective response in tumors than previously demonstrated for EGFRwt (Chapter IV.2). Importantly, EGFR-CD533 was demonstrated to also act as a potent inhibitor of EGFRvIII function, abrogating the tumorigenic capacity and the relative radioresistance conferred by EGFRvIII (Chapter IV.2).

In summary, we have demonstrated for the first time that functional inhibition of the ErbB receptor tyrosine kinases through dominant- negative EGFR-CD533 leads to a significant radiosensitization for a broad spectrum of different tumor cells independent of the varying ErbB receptor expression levels. The mechanisms underlying this radiosensitization involve disruption of major ErbB receptor- dependent radiation- induced pro- proliferative and cytoprotective responses, which would normally counteract the toxic effects of radiation through an improved DNA damage repair capacity as a result of the increased biosynthetic activity (Chapter II). Consequently, the further developed gene therapeutic approach of intratumoral application of Ad-EGFR-CD533 into human carcinoma and malignant glioma xenograft conferred a dominant-negative EGFR phenotype and effectively induced tumor radiosensitization by the same mechanisms as in cultured cells (Chapter III). Thus, overexpression of EGFR-CD533 may hold promise to enhance the sensitivity of tumor cells to ionizing radiation.

Furthermore, our studies identified the frequently in many different tumor entities expressed naturally occurring variant of EGFR, EGFRvIII as an important modulator of tumor cell radiosensitivity. This can be explained through a strong radiation- induced activation of EGFRvIII, conferring a more intense downstream activation of pro-proliferative and anti-apoptotic MAPK and PI3K signalling cascades leading to a stronger cytoprotective response to radiation than previously known for EGFRwt. Importantly, our studies also assessed that expression of EGFR-CD533 effectively inhibits this EGFRvIII function, thus affirming the broad potential of EGFR-CD533 to radiosensitize human tumors (Chapter IV).

Our data confirm that the genetic inhibition of the radiation- induced activation of the ErbB receptor tyrosine kinases as well as the variant EGFRvIII through dominant-negative EGFR-CD533 represents an effective and broadly applicable new therapeutic intervention for tumor cell radiosensitization. It should therefore be further developed as a promising gene therapeutic innovation for the treatment of cancer through tumor cell radiosensitization

V.2. General discussion

We and others have presented data supporting the hypothesis that radiation- induced activation of ErbB receptors results in cytoprotective signalling that mediates proliferative and biosynthetic responses (13,16,21-24). This ErbB function can be effectively modulated by a gene therapeutic approach of over-expressing dominant-negative EGFR by use of adenoviral delivery, leading to tumor cell radiosensitization after single and repeated radiation exposures both in vitro and in vivo (Chapter III.3).

Since EGFR and the ErbB receptors have emerged as promising targets in radiotherapy, extensive research activity explores potential procedures to target EGFR, the other ErbB receptors and /or its downstream pathways for radiotherapy to enhance radiation action in human carcinomas and malignant gliomas. Over the past several years, it has been recognized that beside our gene therapeutic intervention, antibodies and small- molecule inhibitors can be used therapeutically to disturb EGFR and/or ErbB signalling at the cellular level. These approaches include monoclonal antibodies directed against the receptors, synthetic tyrosine kinase inhibitors that act directly on the cytoplasmic domain of EGFR and / or other ErbB molecules.

V.2.1 The antibody approach

Various groups have generated a number of antibodies directed against EGFR. Two such antibodies, M225 and M528, were found to compete with EGF binding, inhibit EGF-induced tyrosine kinase-dependent phosphorylation, and downregulate EGFR expression by inducing receptor internalisation. Among the most promising is IMC-225 (Cetuximab®, ImClone Systems Incorporated, NY,NY, and Bristol-Mayers Squibb Company, Princeton, NJ), a humanized M225, which has a higher affinity for EGFR with a longer half-life (25-27, Review). Another antibody approach, in preclinical trials, targets the novel epitope created by alternative splicing in the EGFRvIII mutation (28 review).

IV.1. Samenvatting

(References are listed in Chapter V.4)

De epidermale groeifactor receptor (EGFR) en andere ErbB receptor-tyrosine kinasen spelen een belangrijke rol in de neoplastische groeicontrolle van veel carcinoom- en glioomcellen (1-4). Dit is het gevolg van de ongecontroleerde activering van receptor-tyrosine kinasen met daaraan gekoppelde secundaire stimulatie van downstream signaal transductie cascade (4). Zoals het geval is met andere groeifactorreceptoren, kan toename van EGFR-expressie het gevolg zijn van amplificatie (genvermeerdering), toename van transcriptie, mRNA-translatie of mutatie. Dit heeft een ongereguleerd toegenomen receptorsignaal tot gevolg. Voor veel carcinomen en gliomen is een toegenomen EGFR-activiteit gecorreleerd aan tumorgroei en kwaadaardige progressie (5,6). De overexpressie van EGFR in autocriene groei gereguleerde carcinoom- and glioomcellen is onderdeel van de neoplastische progressie en is frequent geassocieerd met de expressie van mutant vormen (5,7-10). De meest frequente EGFR-mutatie is een variant, EGFRvIII genaamd, welke het resultaat is van het wegvallen van exonen 2-7 van het EGFR-gen (8). Deze mutatie resulteert in een receptor met een constitutief actieve tyrosine kinase, welke ligand-onafhankelijk celtransformatie kan induceren (6,11). EGFRvIII is alleen aanwezig op het celoppervlak van tumoren, niet in normale weefsels (5,7). Een andere waarneming is dat deze receptor alleen in vivo op tumorcellen tot expressie komt en snel verdwijnt in tumorcellen in kweek. Om deze reden zijn studies naar de werking en unieke functies van EGFRvIII tot op heden slechts beperkt uitgevoerd.

Eerder uitgevoerd onderzoek heeft aangetoond dat bestraling van tumorcellen kan resulteren in een directe activering van de ErbB-receptor familie en dat herhaaldelijke blootstelling aan een bestraling van 2 Gy kan leiden tot een toegenomen expressie van EGFR (12-14). Deze door straling geïnduceerde activering van EGFR wordt gekenmerkt door een veelvuldige toename van de tyrosine fosforylatie met een secundaire activering van bestaande 'signaal transductie cascades' van MAPK en PI-3-K (12, 15-17). De door straling geïnduceerde activering van de EGFR-receptorfamilie leidt tot een dosisafhankelijke proliferatieve respons, welke gemeten kan worden na zowel eenmalige als herhaaldelijke blootstelling aan straling (13, 16, 18). Hieruit is afgeleid dat de door straling geïnduceerde activering van EGFR betrokken is bij (het mechanisme van) versnelde proliferatie of hernieuwde populatie van kanker cellen. Deze cellulaire proliferatieve respons na herhaaldelijke blootstelling aan straling leidt tot een toename van unieke tumor klonen. (19,20). Gezien de toegenomen biosynthetische activiteit van snel prolifererende tumorcellen, zal dit waarschijnlijk gepaard gaan met een verhoogde reparatie van DNA-schade.

Zowel de stralinggeïnduceerde proliferatieve reactie als de verbeterde DNA reparatiemogelijkheid van tumorcellen verminderen de toxische effecten van radiotherapie. Om deze reden wordt het EGFR-geïnduceerde effect op tumorcellen als celbeschermend (cytoprotectieve respons) gezien. Gegeven de speciale rol van de EGFR-familie in het initiëren van deze cytoprotectieve respons na bestraling, zou verstoring van de ErbB-receptorfunctie de cytoprotectieve respons moeten voorkomen and daardoor de gevoeligheid voor bestraling van de tumorcel kunnen verhogen.

Het promotieonderzoek wat hier beschreven wordt is gebaseerd op de hypothese dat het voorkomen van door straling geïnduceerde activering van de EGFR-respons, de gevoeligheid voor bestraling van de tumorcellen kan verbeteren, onafhankelijke van variërende ErbB-expressieprofielen. Om de functie van de EGFR-receptorfamilie effectief te blokkeren hebben we een genetische benadering van adenovirale overexpressie van een dominant-negatieve EGFR toegepast, EGFR-CD533 genaamd (Figure 1.1.5). EGFR-CD533 heeft als voordeel dat het niet alleen de functie van EGFR zelf onderdrukt, maar ook de functie van het gehele ErbB-receptor-tyrosine kinase netwerk alsmede de functie van het natuurlijk voorkomende mutanten EGFR soorten.

Ten eerste was het belangrijk om te bepalen in welke mate de ErbB 1-4 receptor tyrosine kinasen een rol spelen in de stralings geïnduceerde signaal transductie van menselijke tumorcellen. Voorheen werd aangenomen dat de gevolgen downstream van de door straling geïnduceerde activering van de ErbB receptoren niet te onderscheiden waren van activering door groeifactoren. Om de mogelijke verschillende downstream-effecten door groeifactoren en straling te identificeren hebben we de effecten in verschillende kankercellijnen uit de borstklier vergeleken, welke verschilden in hun ErbB-expressieprofielen. Een belangrijke vinding was dat we konden aantonen dat in tegenstelling tot behandeling van cellen met groeifactor ErbB1 of ErbB4, welke resulteerde in hiërarchische transactivering van ErbB2 en ErbB3, bestraling zonder onderscheid alle ErbB soorten met een activeringsprofiel dat overeenkwam met het ErbB expressieprofiel van de cel, activeerde (Hoofdstuk II.1). Bovendien werd ErbB2 geïdentificeerd als een afgeleide van ErbB1 of ErbB4, hetgeen leidde tot andere downstream MAPK respons profielen na blootstelling aan straling (Hoofdstuk II.1). Om deze reden lieten onze data voor de eerste keer zien dat ErbB expressieprofielen van menselijke kankercellen de ErbB-receptoractivering kan beïnvloeden als reactie op ioniserende straling. Daarom zouden therapeutische interventies die als doel hebben om humane tumorcellen gevoeliger te maken voor bestraling, de remming van de functie van het gehele ErbB receptor-tyrosine kinase netwerk in acht moeten nemen, zodat de gevoeligheid voor bestraling effectief verhoogd wordt, onafhankelijk van de variërende ErbB-expressieprofielen. Deze vinding moedigde ons aan om verder te gaan met de ontwikkeling van een genetische benadering van de

remming van het ErbB-receptor tyrosine netwerk door middel van expressie van dominant-negatief EGFR-CD533.

We hebben daarom de mogelijkheid van een gentherapeutische benadering verder onderzocht. We hebben hiervoor gebruik gemaakt van een adenovirus dat zich niet kan vermeerderen voor de overdracht van EGFR-CD533, met als doel de gevoeligheid voor bestraling te verhogen. In het onderzoek werd de directe stralengevoeligheid in vitro gemeten voor een breed spectrum van verschillende tumorcellijnen met variërende expressieprofielen voor de ErbB-receptoren (Hoofdstuk II.2). Nadat we alle geteste cellijnen hadden gekarakteriseerd op de verschillen in ErbB-receptorexpressieprofielen en de experimentele condities hadden geoptimaliseerd voor de adenovirale genoverdracht van EGFR-CD533, lieten onze experimenten complete remming van stralinggeïnduceerde activering van EGFR zien na EGFR-CD533 expressie. Klonogene overleving analyses koppelden de expressie van EGFR-CD533 aan een significante toename van de intrinsieke stralengevoeligheid van alle geteste cellijnen, na zowel een enkele als herhaaldelijke blootstellingsexperimenten (Hoofdstuk II.2; Hoofdstuk III.2). We kunnen daarom concluderen dat onze gegevens bewijs leveren voor de constatering dat alle cellijnen die getest werden effectief een transductie kunnen ondergaan, zodat ze EGFR-CD533 tot expressie kunnen brengen, gebruik makend van een gentherapeutische benadering door Ad-EGFR-CD533 te gebruiken, en dat de geteste cellijnen effectief gevoeliger werden gemaakt voor ioniserende straling.

Voornoemde resultaten brachten ons ertoe om de gentherapeutische benadering in vivo verder te testen in getransplanteerde tumoren. We hebben daarvoor de adenovirale vector met EGFR-CD533 ingebracht in de (te transplanteren) tumorcellen in naakte muizen en vervolgens bepaald of het percentage met recombinant adenovirus geïnfekteerde tumorcellen de tumorrespons op ioniserende straling kon beïnvloeden. Verder hebben we de data uit in vivo en in vitro experimenten gekoppeld om te onderzoeken of het mechanisme wat de toename van de gevoeligheid voor bestraling in vitro bepaalde hetzelfde was als het mechanisme wat in vivo in werking werd gesteld. Om de gevoeligheid van U-87 MG cellen en MDA-MB-231 cellen voor transductie met adenovirus te bepalen, hebben we eerst de optimale transductie condities vastgesteld door gebruik van het Ad-LacZ reporter virus, waarbij een respectievelijk 59-65% en 44% transductie efficiency werden bereikt (Hoofdstuk III). Onder deze condities resulteerde intra-tumorale toevoeging van Ad-EGFR-CD533 in een significante hogere gevoeligheid voor bestraling, resulterend in een dosis versterkende factor (dose-enhancement ratio) van respectievelijk 1.8 en 1.85 na drie herhaalde blootstellingen aan bestraling van 3 en 1.5 Gy voor U-87MG en MDA-MB-231 tumoren. Dit was vergelijkbaar met de mate van verhoging van stralengevoeligheid verkregen met cellen van MDA-

EGFR-CD533 tumoren, waarin alle cellen bewerkt zijn om stabiel EGFR-CD533 tot overexpressie te brengen (Hoofdstuk III.3). Deze gegevens tonen aan dat een gentherapeutische benadering waarbij een dominant-negatief EGFR-CD533 tot overexpressie wordt gebracht door in vivo gebruik te maken van overdracht door een adenovirale vector, effectief de stralengevoeligheid van xenograft tumoren kan verhogen na herhaalde blootstelling aan bestraling. Het mechanisme wat de stralengevoeligheid verhoogt is hetzelfde in xenograft tumoren als in gekweekte cellen, wat de therapeutische mogelijkheden van deze benadering bevestigt (Hoofdstuk III.3).

Een ander belangrijk aspect van dit promotieonderzoek betreft onderzoek naar de overdrachtseffecten van EGFRvIII op acute cellulaire reacties op bestraling and mogelijke invloeden op de tumorceloverleving na bestaling. Omdat EGFRvIII niet tot expressie wordt gebracht in gekweekte cellen hebben we eerst een studie naar de werking gedaan in CHO (Chinese hamster ovarii) cellen die kortstondig getransfecteerd waren met EGFRvIII cDNA (Hoofdstuk IV.1). Zoals verwacht, activeerde EGF wel EGFRwt, maar niet EGFRvIII. Een enkele blootstelling aan straling van 2 Gy daarentegen resulteerde in een onmiddellijke 4.3-voud toename van Tyr (tyrosine) fosforylatie, welke onmiddellijk een secundaire downstream toename in MAPK en Akt-activiteit induceerde, waarbij de toename door stralinggeïnduceerde EGFRwt activering ruim werd overschreden (Hoofdstuk IV.1). Stralinggeïnduceerde activering van EGFRvIII resulteerde dus in een effectieve verandering in de CHO-cel gevoeligheid voor bestraling (Hoofdstuk IV.1). Op deze wijze werd EGFRvIII als een ander belangrijk therapeutisch doelwit geïdentificeerd om ons op te richten voor het verhogen van de stralengevoeligheid van tumorcellen.

Om vervolgens onderzoek naar de functie van EGFRvIII in vitro in humane maligne glioomcellen mogelijk te maken, daarbij rekening houdend met de frequente expressie van EGFRvIII in maligne glioomtumoren, hebben we een adenovirale vector ontwikkelt om EGFRvIII tot overexpressie te brengen in gekweekte cellen in vitro. Verder hebben we de EGFRvIII-functie onderzocht tijdens intrinsieke expressie in xenograft tumoren en bovendien hebben we het mogelijk gebruik van Ad-EGFR-CD533 om de EGFRvIII-functie in vivo en in vitro te remmen onderzocht. Ons onderzoek toonde aan dat ioniserende straling in een significante activering van EGFRvIII in vivo resulteert, hetgeen een krachtiger cytoprotectieve respons in tumoren tot stand brengt dan voorheen gedemonstreerd voor EGFRwt (Hoofdstuk IV.2). Bovendien werd aangetoond dat EGFR-CD533 ook als een mogelijke remmer van de EGFRvIII-functie optreedt, daarbij de gezelverwekkende capaciteit en de relatieve stralengevoeligheid veroorzaakt door EGFRvIII tenietdoend (Hoofdstuk IV.2).

Samenvattend hebben we voor de eerste keer aangetoond dat functionele remming van de ErbB-receptor tyrosine kinasen door dominant-negatief EGFR-CD533 tot een significant hogere gevoeligheid voor bestraling leidt voor een breed spectrum van verschillende tumorcellen, onafhankelijk van de variërende niveaus van de ErbB-receptor. Het mechanisme wat de hogere stralengevoeligheid verklaart heeft betrekking op de vernietiging van de belangrijke ErbB-receptor afhankelijke stralinggeïnduceerde pro-proliferatieve en cytoprotectieve reactie, welke normaal gesproken de toxische effecten van bestraling zou tegenwerken door een betere capaciteit om DNA-schade te repareren, welke veroorzaakt wordt door een toegenomen biosynthetische activiteit (Hoofdstuk II). Daarom toonde de verder ontwikkelde gentherapeutische benadering van de intratumorale toediening van Ad-EFGR-CD533 in humane tumoren en maligne glioom xenograften een dominant-negatief EGFR fenotype en werd de gevoeligheid voor bestraling van tumoren volgens hetzelfde mechanisme als in gekweekte cellen effectief verhoogd (Hoofdstuk III). Overexpressie van EGFR-CD533 kan dus een belangrijke mogelijkheid bieden voor verbetering van de gevoeligheid van tumorcellen voor ioniserende stralen.

Bovendien heeft ons onderzoek de frequent in veel verschillende tumoren natuurlijk voorkomende variant van EGFR, EGFRvIII, geïdentificeerd als belangrijke overbrenger van stralengevoeligheid van tumorcellen. Dit kan worden verklaard door een sterke stralinggeïnduceerde activering van EGFRvIII, resulterend in een meer intensieve downstream activering van pro-proliferatieve and antiapoptose MAPK and PI3K signaal cascades, welke leidt tot een sterkere celbeschermende reactie op bestraling, dan voorheen bekend was voor EGFRwt. Een belangrijke conclusie uit ons onderzoek is ook dat expressie van EGFR-CD533 effectief de EGFRvIII-functie remt, daarbij de brede mogelijkheden om EGFR-CD533 te gebruiken om humane tumoren gevoeliger te maken voor bestraling bevestigend (Hoofdstuk IV).

Onze gegevens bevestigen dat genetische remming van stralinggeïnduceerde activering van de ErbB-receptor tyrosine kinasen als ook van de variant EGFRvIII door de dominant-negatieve EGFR-CD533 een effectieve en breed toepasbare nieuwe therapeutische interventie voor verhoogde stralengevoeligheid van tumorcellen biedt. Dit zou verder ontwikkeld moeten worden als een veelbelovende gentherapeutische innovatie voor de behandeling van kanker door verhogen van de stralengevoeligheid van tumorcellen.